

0050680P1C

$\frac{2}{2}$ VS

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 1999年10月4日

出願番号
Application Number: 平成11年特許願第283437号

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号
the country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

JP1999-283437

出願人
Applicant(s): オリンパス株式会社

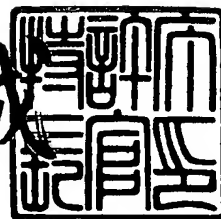
CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

2006年11月24日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

中嶋

誠



【書類名】 特許願

【整理番号】 A009805091

【提出日】 平成11年10月 4日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明の名称】 標識を用いた核酸分析方法

【請求項の数】 18

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都八王子市下柚木 3 - 2 - 6 - 5 0 1

 【氏名】 陶山 明

【特許出願人】

 【識別番号】 000000376

 【氏名又は名称】 オリンパス光学工業株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100058479

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 鈴江 武彦

 【電話番号】 03-3502-3181

【選任した代理人】

 【識別番号】 100084618

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 村松 貞男

【選任した代理人】

 【識別番号】 100068814

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 坪井 淳

●
【選任した代理人】

【識別番号】 100100952

【弁理士】

【氏名又は名称】 風間 鉄也

【選任した代理人】

【識別番号】 100097559

【弁理士】

【氏名又は名称】 水野 浩司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 011567

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9602409

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 標識を用いた核酸分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質を含む A プローブと、

前記目的とする配列の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブを得る工程と、

4) C プローブに具備されるフラッグ配列を、フラッグ配列に相補的な配列にハイブリダイズすることにより C プローブを回収する工程と、並びに

5) 前記 C プローブに具備される標識物質 L を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【請求項 2】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質を含む A プローブ、及び

前記目的とする配列の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列を含む B プローブを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブを得る工程と、

- 4) 得られたCプローブと前記標的核酸分子とを、ディネーチャリングする工程と、並びに
- 5) Cプローブに具備されるフラッグ配列を、フラッグ配列に相補的な配列にハイブリダイズすることによりCプローブを回収する工程と、並びに
- 6) 前記Cプローブに具備される標識物質を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【請求項3】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

- 1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的なA配列と、A配列に結合した任意のA'配列と、A'配列に結合した標的物質Lとを含むAプローブ、及び

前記一部分の配列とは異なる部分の前記目的とする配列の一部分に相補的なB配列と、B配列に結合した任意のフラッグ配列とを含むBプローブを準備する工程と、

- 2) Aプローブ及びBプローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズしたAプローブとBプローブとをライゲーションしてCプローブを得る工程と、

- 4) 得られたCプローブと前記標的核酸分子とを、夫々、一本鎖にする工程と、
- 5) Cプローブに具備されるフラッグ配列を、その配列に相補的な配列であり、且つ固相化した配列にハイブリダイズして分離する工程と、

6) 前記固相化した相補的な配列にハイブリダイズしたCプローブから、少なくともAプローブの部分に具備する部分を回収する工程と、

- 7) 回収されたCプローブのA'配列を、固相化されたその配列に相補的な核酸分子にハイブリダイズすることにより特異的に回収する工程と

8) Cプローブに具備される標識物質を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【請求項4】 請求項1又は2に記載の標的核酸分子を検出する方法であって、前記Aプローブに具備されるA配列と、Bプローブに具備されるB配列とが、前記標的核酸分子の隣り合う塩基を含む塩基配列に相補的な塩基である検出方

法。

【請求項 5】 請求項 1 から 3 の何れか 1 項に記載の標的核酸分子を検出する方法であって、前記 C プローブを得るためのライゲーションをリガーゼを用いて行なう検出方法。

【請求項 6】 前記標識物質が蛍光色素である請求項 1 から 4 の何れか 1 項に記載の検出方法。

【請求項 7】 請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の検出方法であって、前記フラッグ配列及び A' 配列の T_m 値が、A プローブ及び B プローブの他の部分の塩基配列の T_m 値よりも高値となるように設計されていることを特徴とする検出方法。

【請求項 8】 複数の標的核酸分子を同時に検出するための検出方法であって、

1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質とを含む A プローブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列とを含む B プローブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プローブ及び B プローブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし夫々 C プローブ群を得る工程と、

4) 各種類の C プローブに具備される各フラッグ配列を、フラッグ配列に夫々相補的な配列にハイブリダイズすることにより、夫々の C プローブを特異的に回収する工程と、並びに

4) 前記各 C プローブに具備される標識物質 L を、夫々の標的核酸分子毎に検出する工程と、

を具備する検出方法。

【請求項 9】 複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、

1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列

に結合している任意の配列 A' 配列とを含む A プローブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した高親和性物質 Y とを含む B プローブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プローブ及び B プローブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブ群を得る工程と、

4) 前記高親和性物質 X を対応する固相化高親和性物質 S に結合することにより C プローブを回収し、C プローブに具備される A' 配列を夫々増幅し、この増幅により得られる核酸分子の末端に高親和性物質 X を付与する工程と、

5) 前記高親和性物質 Y に対して特異的に高親和性を有する物質 S S に該高親和性物質 X を結合することにより前記増幅により得られた核酸分子を回収する工程と、並びに

4) 工程 5) で回収された前記増幅により得られた核酸分子群について夫々検出する工程と

を具備する検出方法。

【請求項 1 0】 請求項 9 に記載の複数の標的核酸分子を検出する方法であって、前記高親和性物質 X 又は S の何れか一方がビオチンであり、もう一方がアビジンである検出方法。

【請求項 1 1】 請求項 9 に記載の複数の標的核酸分子を検出する方法であって、前記高親和性物質 Y 又は S S の何れか一方がビオチンであり、もう一方がアビジンである検出方法。

【請求項 1 2】 請求項 9 又は 1 0 の何れか 1 項に記載の複数の標的核酸分子の検出方法であって、更に、

a) 請求項 9 の工程 5) で回収した前記増幅により得られた核酸分子群を、夫々の配列に相補的な塩基配列であって且つ標識物質 L を結合した配列に対してハイブリダイズする工程と、

b) 前記ハイブリダイズにより得られた二本鎖をディネーチャリングする工程

と、前記標識物質 L を有する相補的な塩基配列を、夫々に相補的な配列に結合することにより各配列毎に回収する工程と、並びに、

c) 前記標識物質 L を検出することにより標的核酸分子を検出する工程と、により検出がなされる検出方法。

【請求項 1 3】 複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、

1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している高親和性物質 X とを含む A プローブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した 4 ユニットの核酸配列からなる任意の B' 配列とを含む B プローブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プローブ及び B プローブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブ群を得る工程と、

4) 前記高親和性物質 X をそれに対して高親和性を有する物質 S に結合することにより C プローブを回収し、C プローブに具備される B' 配列を夫々増幅し、増幅により得られた核酸分子 C 配列の末端に高親和性物質 Y を付与する工程と、

5) 前記高親和性物質 Y に対して特異的に高親和性を有する物質 S S に該高親和性物質 X を結合することにより前記増幅により得られた核酸分子 C 配列を回収する工程と、

5) 回収された各核酸分子 C 配列のユニット部分に、夫々の配列に相補的な配列を有する核酸分子 D 配列をハイブリダイズし、更に該核酸分子 D 配列に標識物質 L を結合する工程と、並びに、

6) 前記核酸分子 D 配列を、各々の配列に相補的な配列の核酸分子であり、且つ担体に固相化された核酸分子に結合することにより特異的に回収し、その後、該核酸分子 D 配列に具備される標識物質 L を検出することにより複数の標的核酸分子の配列を解析する工程と

を具備する標的核酸分子の検出方法。

【請求項 1 4】 請求項 1 2 に記載の複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、前記 B 配列に結合した 4 ユニットの核酸配列の配列を（S D、D 0、D 1、E D）で示すとき、S D 及び E D の配列は P C R 増幅においてプライマーの役割を有する配列であることを特徴とする検出方法。

【請求項 1 5】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

5) 前記プローブ C に具備される前記工程で結合に関与しない標的物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法。

【請求項 1 6】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と

- 、
- 3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズしたAプローブとBプローブとをライゲーションしてプローブCを得る工程と、
 - 4) 前記プローブCを標的核酸分子から分離、或いは前記プローブCに結合した標的核酸分子を分解する工程と、
 - 5) プローブCに具備される標識物質A t a g 或いはB t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブCを回収する工程と、
 - 6) 前記プローブCに具備される前記工程で結合に関与しない標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、
- を具備する検出方法。

【請求項 1 7】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

- 1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的なA配列と、A配列に結合している標識物質A t a g を含むAプローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的なB配列と、B配列に結合している標識物質B t a g を含むBプローブとを準備する工程と、

- 2) Aプローブ及びBプローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、
- 3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズしたAプローブとBプローブとをライゲーションしてプローブCを得る工程と、
- 4) プローブCに具備される標識物質A t a g 或いはB t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブCを回収する工程と、
- 5) 前記プローブCを高親和性物質S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブCを再び回収する工程と、

6) 前記プローブCに具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【請求項 1 8】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブCを得る工程と、

4) 前記プローブCを標的核酸分子から分離、或いは前記プローブCに結合した標識核酸分子を分解する工程と、

5) プローブCに具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] にたいして特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブCを回収する工程と、

6) 前記プローブCを高親和性物質 S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブCを再び回収する工程と、

7) 前記プローブCに具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、試料中の核酸分子を検出する技術に関し、詳しくは、目的とする核酸分子を高精度に検出、又は定量することが可能である核酸分析方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

分子生物学において、生体試料中に存在する目的とするDNA又はRNA等の核酸分子（以下、標的核酸分子と称する）を検出することは非常に意義のあることである。特に、核酸分子の検出は、例えば、特定の臓器で、発現し、機能する蛋白質についての核酸分子レベルでの解析や、また、末梢神経系、中枢神経系又は免疫系等の情報伝達系における蛋白質の発現の制御に関する研究等を行なう場合に重要である。また、遺伝子病に関連する変異遺伝子の検出、癌の診断、ウイルス関連遺伝子の検出等の遺伝子診断においても重要な技術である。

【 0 0 0 3 】

従来から使用されている核酸検出方法は、多量の試料を必要とし、煩雑且つ多くの工程を含む方法である。また、多くの場合、その実施において、従事者は熟練者であることが要求され、且つその操作には長時間が必要とされる。また、遺伝子診断は、通常、確定診断として用いられるため、誤診は許されず、更に検査の迅速性も要求される。従って、検査時間を短縮し、検出を高精度に行ない得る方法が要求されている。しかし、現在、それらを満足する方法はない。

【 0 0 0 4 】

例えば、従来使用される代表的な標的核酸分子の検出方法は、ハイブリダイゼーション法である。これは、核酸同士の相補的結合反応（以下、ハイブリダイゼーション反応と称する）を利用する方法である。標的核酸分子の一部と相補的な塩基配列を有する核酸分子である核酸プローブ（以下、プローブと称する）を用いる。一般的に、ハイブリダイゼーション反応は、他の結合反応よりも標的核酸分子に対する特異親和性に優れているため広汎に使用される。しかしながら、ハイブリダイゼーション法は以下のような問題点を有している。

【 0 0 0 5 】

先ず、非特異性結合の問題である。即ち、条件によって、標的核酸分子と完全には一致しない核酸分子にまでプローブ分子がハイブリダイズしてしまう問題である。この反応を避けるために、ハイブリダイゼーション法は、温度、イオン強

度、変性処理剤の最適化、及び洗浄方法等に関する厳格さを要求しなくてはならない。しかしながら、厳格な反応を遂行した場合には、特異的な結合さえも減少してしまうという新たな問題が生じることになる。従って、これらは、検出感度の低下および反応特異性の減少という大きな2つの問題点を引き起こす。

【0006】

一方、ヒトゲノムDNAのような高度に複雑なDNAの場合には、最も特異的なプローブでさえも、ゲノムDNA中の標的核酸分子以外の核酸分子と部分的にハイブリダイズする可能性ある。従って、好ましくないシグナルが生じる可能性があるのである。

【0007】

以上の問題に対応する方法として、例えば、PCR法が用いられている。これは、ハイブリダイゼーションの反応を改善することを目的とするものではなく、試料中の核酸分子を増加することにより、高感度を達成するものである。従って、これは、根本なハイブリダイゼーション反応そのものがもたらす、特異性の問題を解決するものではない。特に、多種類のプローブを用いて、同一の生物試料中の多種類の標的核酸分子を検出する場合には、依然として、非特異的ハイブリダイゼーション反応を回避することはきわめて困難である。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

上記の情況に鑑み、本発明は、プローブと標的核酸分子とのハイブリダイゼーション反応を特異的に実施できる核酸分子検出方法を提供することを目的とする。また、本発明は、特異的にハイブリダイズしたプローブを高精度に且つ効率よく検出することにより、目的とする標的核酸分子を高精度に且つ効率よく検出することができる方法を提供することを目的とする。特に、本発明は、多種類の標的核酸分子を、高精度に且つ効率よく同時に検出することが可能な核酸分子検出方法を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するための手段として、本発明者らは鋭意研究の結果、以下の

方法を開発した。即ち；

(1) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質を含む A プローブと、

前記目的とする配列の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブを得る工程と、

4) C プローブに具備されるフラッグ配列を、フラッグ配列に相補的な配列にハイブリダイズすることにより C プローブを回収する工程と、並びに

5) 前記 C プローブに具備される標識物質 L を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法；

(2) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質を含む A プローブ、及び

前記目的とする配列の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列を含む B プローブを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブを得る工程と、

4) 得られた C プローブと前記標的核酸分子とを、ディネーチャリングする工程と、並びに

5) C プローブに具備されるフラッグ配列を、フラッグ配列に相補的な配列にハイブリダイズすることにより C プローブを回収する工程と、並びに

6) 前記Cプローブに具備される標識物質を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法；

(3) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的なA配列と、A配列に結合した任意のA'配列と、A'配列に結合した標的物質Lとを含むAプローブ、及び

前記一部分の配列とは異なる部分の前記目的とする配列の一部分に相補的なB配列と、B配列に結合した任意のフラッグ配列とを含むBプローブを準備する工程と、

2) Aプローブ及びBプローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズしたAプローブとBプローブとをライゲーションしてCプローブを得る工程と、

4) 得られたCプローブと前記標的核酸分子とを、夫々、一本鎖にする工程と、

5) Cプローブに具備されるフラッグ配列を、その配列に相補的な配列であり、且つ固相化した配列にハイブリダイズして分離する工程と、

6) 前記固相化した相補的な配列にハイブリダイズしたCプローブから、少なくともAプローブの部分に具備する部分を回収する工程と、

7) 回収されたCプローブのA'配列を、固相化されたその配列に相補的な核酸分子にハイブリダイズすることにより特異的に回収する工程と

8) Cプローブに具備される標識物質を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法；

(4) 請求項1又は2に記載の標的核酸分子を検出する方法であって、前記Aプローブに具備されるA配列と、Bプローブに具備されるB配列とが、前記標的核酸分子の隣り合う塩基を含む塩基配列に相補的な塩基である検出方法；

(5) 請求項1から3の何れか1項に記載の標的核酸分子を検出する方法であって、前記Cプローブを得るためのライゲーションをリガーゼを用いて行なう検出方法；

(6) 前記標識物質が蛍光色素である請求項1から4の何れか1項に記載の検出方法；

(7) 請求項 1 から 6 の何れか 1 項に記載の検出方法であって、前記フラッグ配列及び A' 配列の T_m値が、A プローブ及び B プローブの他の部分の塩基配列の T_m値よりも高値となるように設計されていることを特徴とする検出方法；

(8) 複数の標的核酸分子を同時に検出するための検出方法であって、
1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標的物質とを含む A プローブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した任意のフラッグ配列とを含む B プローブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プローブ及び B プローブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし夫々 C プローブ群を得る工程と、

4) 各種類の C プローブに具備される各フラッグ配列を、フラッグ配列に夫々相補的な配列にハイブリダイズすることにより、夫々の C プローブを特異的に回収する工程と、並びに

4) 前記各 C プローブに具備される標識物質 L を、夫々の標的核酸分子毎に検出する工程と、

を具備する検出方法；

(9) 複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、

1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している任意の配列 A' 配列とを含む A プローブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した高親和性物質 Y とを含む B プローブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プローブ及び B プローブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブと

をライゲーションし C プロブ群を得る工程と、

4) 前記高親和性物質 X を対応する固相化高親和性物質 S に結合することにより C プロブを回収し、C プロブに具備される A' 配列を夫々増幅し、この増幅により得られる核酸分子の末端に高親和性物質 X を付与する工程と、

5) 前記高親和性物質 Y に対して特異的に高親和性を有する物質 S S に該高親和性物質 X を結合することにより前記増幅により得られた核酸分子を回収する工程と、並びに

4) 工程 5) で回収された前記増幅により得られた核酸分子群について夫々検出する工程と

を具備する検出方法；

(10) 請求項 9 に記載の複数の標的核酸分子を検出する方法であって、前記高親和性物質 X 又は S の何れか一方がビオチンであり、もう一方がアビジンである検出方法；

(11) 請求項 9 に記載の複数の標的核酸分子を検出する方法であって、前記高親和性物質 Y 又は S S の何れか一方がビオチンであり、もう一方がアビジンである検出方法；

(12) 請求項 9 又は 10 の何れか 1 項に記載の複数の標的核酸分子の検出方法であって、更に、

a) 請求項 9 の工程 5) で回収した前記増幅により得られた核酸分子群を、夫々の配列に相補的な塩基配列であって且つ標識物質 L を結合した配列に対してハイブリダイズする工程と、

b) 前記ハイブリダイズにより得られた二本鎖をディネーチャリングする工程と、前記標識物質 L を有する相補的な塩基配列を、夫々に相補的な配列に結合することにより各配列毎に回収する工程と、並びに、

c) 前記標識物質 L を検出することにより標的核酸分子を検出する工程と、により検出がなされる検出方法；

(13) 複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、

1) 各々目的とする配列毎に該配列の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している高親和性物質 X とを含む A プロブ群と、

各々目的とする配列毎に前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合した 4 ユニットの核酸配列からなる任意の B' 配列とを含む B プロブ群とを準備する工程と、

2) 標的核酸配列分子毎に、対応する夫々の A プロブ及び B プロブと各標的核酸配列分子とをハイブリダイズする工程と、

3) 各々同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プロブと B プロブとをライゲーションし C プロブ群を得る工程と、

4) 前記高親和性物質 X をそれに対して高親和性を有する物質 S に結合することにより C プロブを回収し、C プロブに具備される B' 配列を夫々増幅し、増幅により得られた核酸分子 C 配列の末端に高親和性物質 Y を付与する工程と、

5) 前記高親和性物質 Y に対して特異的に高親和性を有する物質 S S に該高親和性物質 X を結合することにより前記増幅により得られた核酸分子 C 配列を回収する工程と、

5) 回収された各核酸分子 C 配列のユニット部分に、夫々の配列に相補的な配列を有する核酸分子 D 配列をハイブリダイズし、更に該核酸分子 D 配列に標識物質 L を結合する工程と、並びに、

6) 前記核酸分子 D 配列を、各々の配列に相補的な配列の核酸分子であり、且つ担体に固相化された核酸分子に結合することにより特異的に回収し、その後、該核酸分子 D 配列に具備される標識物質 L を検出することにより複数の標的核酸分子の配列を解析する工程と

を具備する標的核酸分子の検出方法；

(14) 請求項 12 に記載の複数の標的核酸分子を同時に検出するための方法であって、前記 B 配列に結合した 4 ユニットの核酸配列の配列を (S D、D 0、D 1、E D) で示すとき、S D 及び E D の配列は P C R 増幅においてプライマーの役割を有する配列であることを特徴とする検出方法；

(15) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プロブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相

補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

5) 前記プローブ C に具備される前記工程で結合に関与しない標的物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法；

(16) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) 前記プローブ C を標的核酸分子から分離、或いは前記プローブ C に結合した標的核酸分子を分解する工程と、

5) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

6) 前記プローブ C に具備される前記工程で結合に関与しない標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、

を具備する検出方法；

(17) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

5) 前記プローブ C を高親和性物質 S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブ C を再び回収する工程と、

6) 前記プローブ C に具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法；

(18) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをラ

イゲーションしてプローブCを得る工程と、

4) 前記プローブCを標的核酸分子から分離、或いは前記プローブCに結合した標識核酸分子を分解する工程と、

5) プローブCに具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] にたいして特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブCを回収する工程と、

6) 前記プローブCを高親和性物質 S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブCを再び回収する工程と、

7) 前記プローブCに具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法である。

【0010】

【発明の実施の形態】

I. 検出方法の原理

本発明の検出方法の概要は、以下の通りである。即ち、目的とする標的核酸分子の配列の一部分に対して夫々相補的な配列を有する2つのプローブ、即ちAプローブとBプローブを、該標的核酸分子にハイブリダイズし、次に2つの該プローブをライゲーションしてCプローブとし、該標的核酸分子とCプローブからなる二本鎖をディネーチャリングした後で、得られたCプローブを検出することにより標的核酸分子を検出する方法である。

【0011】

ここで、Cプローブの検出は、例えば、Cプローブに含まれるBプローブに由来する配列に相補的な配列に結合することによって特異的に回収することと、及びAプローブに由来する標識物質を検出することとにより行われる。或いは、Cプローブの検出は、Cプローブに含まれるBプローブに由来する配列に相補的な配列に結合することによって特異的に回収することと、前記回収されたCプローブをAプローブに由来する配列によって更に特異的に回収することと、及びそれ

により高精度に回収されたCプローブについてそこに含まれるAプローブ由来の標識物質を検出することにより行われる。

【0 0 1 2】

このようにAプローブとBプローブを確実に含むCプローブのみを、特異的に選別して回収することにより、未反応のプローブや非特異的にハイブリダイズしたプローブとの識別を容易にし、それにより、標的核酸分子の存在の正確な指標とすることが可能となる。従って、本方法は、より正確な検出結果を得ることが可能である。

【0 0 1 3】

I I. 検出方法

次に、本発明の検出方法の幾つかの好ましい例を図 1、2 及び 3 を用いて、夫々説明する。

【0 0 1 4】

例 1 基本的な検出方法

最も基本的な本発明の検出方法を図 1 のフローチャートを用いて説明する (図 1)。この方法では、以下に示すような 2 種類の核酸プローブ (以下、単にプローブと称す)、即ち、A プローブ及び B プローブが使用される (図 1 a)。

【0 0 1 5】

A プローブは、該標的核酸分子 5 の一部の領域の塩基配列に相補的な A 配列 3 と、A 配列 3 に結合する標識物質 7 からなる。ここで、標識物質 7 は、直接に A 配列 3 に結合しても、又は、任意の塩基配列 4 を介して間接的に A 配列 3 に結合してもよい。間接的に結合する場合の任意の配列 4 は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸分子上の塩基配列に非相補的な配列である。ここで使用する「非相補的」の語は、標的核酸分子の配列、特に、検出に使用する任意の領域の配列とハイブリダイズしない塩基配列をいう。

【0 0 1 6】

本発明に使用される A 配列 3 は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 2 0 以上の塩基数を有する。

【0 0 1 7】

本発明に使用される標識物質 7 は、一般的に標識物質として使用される如何なる物質をも使用することが可能である。好ましい標識物質は、例えば、蛍光物質、発光物質、 ^{32}P 等の放射性物質、高吸収性物質、高光反射性物質、高電位性物質、磁性物質及び色素等を含み、より好ましくは、F I T C等の蛍光物質である。

【0 0 1 8】

Bプローブ 2 は、標的核酸分子 5 の一部の領域の塩基配列に相補的な配列であって、且つAプローブに具備されるA配列 3 とは異なる配列であるB配列 4 と、B配列 4 に結合した任意のフラッグ配列（以降、F L 配列とも称し、また、図中ではF L 配列と記す）とからなる。

【0 0 1 9】

本発明に使用されるB配列 4 は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは2 0 以上の塩基数を有する。


【0 0 2 0】

フラッグ配列（以降、F L 配列とも称する）は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸分子上の塩基配列に非相補的な配列である。

【0 0 2 1】

また、Aプローブ 1 に具備される標識物質 7 と、Bプローブ 2 に具備されるF L 配列とは、図 1 a に示す通り、両プローブが標的核酸分子の各々目的とする領域に結合したときに、互いに遠方端に位置するように設計されることが好ましい。また、Aプローブ 1 及びBプローブ 2 は、両プローブが標的核酸分子の各々目的とする領域に結合したときに、標的核酸分子の隣り合う塩基に対して相補的な塩基を近方端に有することが好ましい。これにより、以後の工程におけるライゲーションに有利となる。しかし、これらの位置関係は、これに限定されるものではない。Aプローブ 1 及びBプローブ 2 の塩基配列の一部が、標的核酸分子上で互いに重なるような塩基配列を有していてもよい。

【0 0 2 2】



第 1 工程において、上述の通りの A プローブ 1 と B プローブ 2 を、適切な割合で標的核酸分子 5 と混合する（図 1 a）。この場合、A プローブ 1 と B プローブ 2 を予め適切な割合で混合しておいてもよい。また、標的核酸分子 5 を含む試料に各々のプローブを別々に添加してもよい。

【 0 0 2 3 】

第 2 工程では、第 1 工程で混合した溶液をハイブリダイゼーションに適した条件で一定時間インキュベーションすることにより、ハイブリダイゼーション反応を行なう（図 1 b）。

【 0 0 2 4 】

ハイブリダイゼーションは、一般的な何れの手法によっても行なうことが可能である。好ましくは、適切な溶媒、例えば、アマシャム社製のハイブリダイゼーション用緩衝液中で実行されるが、これに限られるものではない。

【 0 0 2 5 】

好ましいハイブリダイゼーションは、先ず、核酸の変性に有効な適宜の高温、例えば、90℃で5分間静置することにより、標的核酸分子の相補的結合を解除して2本鎖から1本鎖へと変性させる。次に、相補的塩基配列の再結合に有効な適宜の温度、例えば50℃にて2時間静置することにより、1本鎖の標的核酸が、相補的な塩基配列と再び結合するように実施される。かかるハイブリダイゼーションは、A プローブ 1 及び B プローブ 2 の両方が同一の標的核酸分子 5 上に結合してハイブリッドを生成する。この工程はハイブリダイゼーションを達成することが目的である。従って、使用する緩衝液の種類、温度条件等は、これに限定される必要はなく、A プローブ 1 及び B プローブ 2 が標的核酸分子 5 にハイブリダイズする条件であれば、どのような条件であってもよい。また、A プローブの A 配列 3 及び B プローブ 2 の B 配列 4 の塩基配列やその長さに応じて、適宜ハイブリダイゼーション反応温度を選択することが好ましい。

【 0 0 2 6 】

第 3 工程は、A プローブ 1 と B プローブ 2 を連結する工程である（図 1 c）。本発明では、標的核酸分子 5 上にハイブリダイズした状態の A プローブ 1 と B プローブ 2 を、直接連結することにより、実質的に、一本の延長したプローブとし

てCプローブ9を生成する。連結する工程(図1c)は、Aプローブ1およびBプローブ2の両方が同一の標的核酸分子に正しくハイブリダイズしていなければ達成することができない処理である。

【0027】

この際、Aプローブ1とBプローブ2の塩基配列が標的核酸分子の隣合った部分を認識する場合には、例えば、サームス・アクアチウス(Taq)DNA・リガーゼ(Thermus aquaticus (Taq) DNA Ligase; New England Biolab社製;以降、Taqリガーゼとも称する)を用いて、Aプローブ1とBプローブ2を連結することが可能である。図示するように、Aプローブ1とBプローブ2の内側の各々の末端部の間に、連結部8が形成されて、Aプローブ1とBプローブ2とが連結する。この連結工程で使用する連結剤は、一般的に使用される連結剤を使用することが可能であり、リガーゼが好ましく、特にTaqリガーゼが好ましい。また、何らかの化学反応をもって連結させることも可能である。

【0028】

また、Aプローブ1の相補的な塩基配列であるA配列3とBプローブ2の相補的な塩基配列であるB配列4とが、標的核酸分子5上の隣合わない塩基配列に対して結合する場合であって、A配列3とB配列4との間に距離が存在しているために、前記距離分だけ標的核酸分子による一本鎖領域が存在する場合には、先ず、A配列3とB配列4との間の部分にTaqポリメラーゼ(宝酒造社製)等の適当なポリメラーゼを処理し、A配列3及びB配列4を伸長した後に、上記リガーゼを用いて両プローブを連結することも可能である。

【0029】

第4工程は、前工程で得た二本鎖をディネーチャリングすることにより、ライゲーション産物であるCプローブ9を標的核酸分子5から切り離す工程である(図1d)。この工程は、Cプローブ9の連結部分8を維持しながら、Cプローブ9を標的核酸分子5から切り離す操作を変性処理を行なうことにより行なうものである。ここで、変性処理は、熱的変性等により行なうことが可能である。例えば、熱的変性により行なう場合には、例えば、90℃で変性することが好ましい。

【 0 0 3 0 】

最終段階である第 5 工程は、得られた C プロブ 9 を特異的に検出する工程である。C プロブ 9 の検出の前又は検出と同時に、B o u n d / F r e e 分離（以降、B / F 分離と称する）を行なうことは、精度を向上する点から好ましい。本発明この B / F 分離は、一般的に使用される B / F 分離に準じて行なうことが可能である。

【 0 0 3 1 】

本発明の方法において、好ましい B / F 分離は、B プロブ 2 の F L 配列 6 に相補的な塩基配列を適当な支持体上に固相化させた固相を用いて、F L 配列 6 を識別することによって行う（図 1 e）。これにより、B プロブ 2 と連結していない全ての A プロブ 1 が除去される。従って、検出ノイズとなる、B プロブ 2 と連結していない A プロブ 1 に含まれる標識物質 7 を除去できるため、検出精度が向上する。

【 0 0 3 2 】

また、この B / F 分離は、F L 配列 6 により、C プロブ 9 を固相支持体に結合した後で、通常、核酸分子の生物学的特性を不活化したり分子構造上のダメージも与えないような洗浄用の液体、例えば、各種緩衝液、希釈液、イオン交換水、生理食塩水を用いて、支持体表面を洗浄すること、又は支持体を前記洗浄用液体を収容した水槽中に浸すこと等により実行される。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法の B / F 分離に用いる固相支持体には、例えば、基板、ビーズ、容器、繊維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等が含まれる。支持体の材質または表面処理は、プローブの固定成績に応じて適宜選ぶのが好ましい。また、支持体への核酸分子の固相化技術は、支持体の種類に応じて、適宜選択することが好ましい。特に、シリコン等の平坦な基板上に、公知の写真印刷技術を応用した表面処理を施した後に、適宜、F L 配列 6 に相補的な塩基配列を含む核酸分子を化学的に結合して製造した固相化基板 1 0 を用いることが好ましい。

【 0 0 3 4 】

具体的には、F L 配列 6 に相補的な塩基配列である a n t i - F L 配列 1 1 を

固相化した基板 1 0 上に、第 4 工程で得た核酸含有液を添加して、上述した第 2 工程の反応条件下でハイブリダイゼーション反応させることにより、少なくとも B プローブ 2 を含む任意の成分、即ち、C プローブ 9 および未反応の B プローブ 2 が固相基板上の配列 1 1 に結合する。場合によっては、B プローブ 2 と相補的な塩基配列を偶然にも有しているような非標的核酸分子（図示せず）とハイブリダイズした、B プローブ 2 が含まれていてもよい。基板 1 0 に対するハイブリダイゼーション反応は、B プローブ 2 および／または C プローブ 9 を固相上に捕捉される。従って、B／F 分離により、ハイブリッドを形成しなかった未反応の標識物質 7 を有効に取り除くことが可能である。

【0 0 3 5】

前記 B／F 分離に次いで、基板 1 0 上で、或いは、脱離処理して適宜の容器内で、得られらた標識物質量を測定する。

【0 0 3 6】

例 2．応用方法（1）

次に、更に検出精度を向上することができる応用例について、図 2 を用いて説明する（図 2）。

【0 0 3 7】

先ず、対象である標的核酸分子 5 を検出するための A プローブ及び B プローブを準備する（図 2 a）。A プローブ 2 1 は以下の通りに準備し、B プローブ 2 2 は、例 1 に記載した通りでよい。

【0 0 3 8】

A プローブ 2 1 は、標的核酸分子 5 の一部の領域の塩基配列に相補的な A 配列 3 と、A 配列 2 3 に結合し且つ任意の塩基配列を有する A' 配列 2 5 と、A' 配列 2 5 に結合する標識物質 2 7 とからなる。

【0 0 3 9】

ここで、本発明に使用される A 配列 2 3 は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 2 0 以上の塩基数を有する。

【0 0 4 0】

本発明に使用される標識物質 2 7 は、一般的に標識物質として使用される如何

なる物質をも使用することが可能である。好ましい標識物質は、例えば、蛍光物質、発光物質、 ^{32}P 等の放射性物質、高吸収性物質、高光反射性物質、高電位性物質、磁性物質及び色素等を含み、より好ましくは、FITC等の蛍光物質である。

【0041】

上記のAプローブ21とBプローブ22を、例1に記載した通りに、標的核酸分子25と混合し、続いて、例1に記載した通りに第4工程まで行なう（図2a～d）。

【0042】

次に、第5工程として、第4工程で得られたプローブ29について、B/F分離を行なう（図2e）。B/F分離は、Bプローブ22のFL配列26に相補的な塩基配列を適当な支持体上に固相化させた固相を用いて、FL配列26を識別することによって行う（図2e）。これにより、Bプローブ22と連結していない全てのAプローブ21が除去される。従って、検出ノイズとなる、Bプローブ22と連結していないAプローブ21に含まれる標識物質27を除去できるため、検出精度が向上する。

【0043】

このB/F分離は、FL配列26により、Cプローブ29を固相支持体に結合した後で、通常、核酸分子の生物学的特性を不活化したり分子構造上のダメージも与えないような洗浄用の液体、例えば、各種緩衝液、希釈液、イオン交換水、生理食塩水を用いて、支持体表面を洗浄すること、又は支持体を前記洗浄用液体を収容した水槽中に浸すこと等により実行される。

【0044】

本発明の方法のB/F分離に用いる固相支持体には、例えば、基板、ビーズ、容器、繊維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等が含まれる。支持体の材質または表面処理は、プローブの固定成績に応じて適宜選ぶのが好ましい。また、支持体への核酸分子の固相化技術は、支持体の種類に応じて、適宜選択することが好ましい。特に、シリコン等の平坦な基板上に、公知の写真印刷技術を応用した表面処理を施した後に、適宜、FL配列26に相補的な塩基配列を含

む核酸分子を化学的に結合して製造した固相化基板 3 0 を用いることが好ましい。
。

【0 0 4 5】

具体的には、F L 配列 2 6 に相補的な塩基配列である a n t i - F L 配列 3 1 を固相化した基板 3 0 上に、第 4 工程で得た核酸含有液を添加して、上述した第 2 工程の反応条件下でハイブリダイゼーション反応させることにより、少なくとも B プローブ 2 2 を含む任意の成分、即ち、C プローブ 2 9 および未反応の B プローブ 2 2 が固相基板 3 0 上の配列 1 1 に結合する。場合によっては、B プローブ 2 2 と相補的な塩基配列を偶然にも有しているような非標的核酸分子（図示せず）とハイブリダイズした、B プローブ 2 2 が含まれていてもよい。基板 3 0 に対するハイブリダイゼーション反応は、B プローブ 2 2 および／または C プローブ 2 9 を固相上に捕捉される。従って、B／F 分離により、ハイブリッドを形成しなかった未反応の標識物質 2 7 を有効に取り除くことが可能である。

【0 0 4 6】

第 5 工程の後、更なる B／F 分離を行なって未反応 B プローブ 2 2 を除去し、且つ標識物質 2 7 の検出を行なう。未反応 B プローブ 2 2 を除去するために、例 1 の第 4 工程と同様の処理を基板 3 0 に対して行い、B プローブ 2 2 及び C プローブ 2 9 を基板 3 0 から脱離する（図 2 f）。

【0 0 4 7】

その後、A プローブ 2 1 の A' 配列 2 5（以降、T a g 配列とも称す）に相補的な塩基配列を、第 5 工程と同様な支持体上に固相化した固相を用いて、A' 配列 2 5 を識別することにより、更なる B／F 分離を行なう（図 1 g）。即ち、この工程により、C プローブ 2 9 を未反応 B プローブ 2 2 から分離することができる（図 2 g）。この工程により、C プローブ 2 9 のみを支持体上に残すことができる。これらの工程を経ることにより、C プローブ 2 9 のみを支持体上に残すことができるため、測定効率は向上する。

【0 0 4 8】

標識物質 2 7 の検出は、標識の種類に応じた、公知の測定機または肉眼等を用いて一般的に使用される方法により定性的ないし定量的に測定することが可能で

ある。例えば、検出手段には、フォトディテクタ、フォトマルチプライヤを使用してよく、これらを用いた場合には、定量測定または微量光測定ができるので好ましい。また、該検出は、顕微鏡により、又は肉眼若しくは自動的に画像解析する手段を用いてもよい。標識物質 2 7 は、測定手段等に応じて適宜選ばばよい。例えば、標識物質 2 7 が F I T C のような蛍光性物質である場合、適宜の蛍光測定機を用いることにより、容易に測定し、データ処理手段を通じて、自動的に定量または定性分析できる。

【0 0 4 9】

これにより、前記連結により得られた C プローブ 2 9 を精度良く検出できる。ここで、2 度に亘って B / F 分離を行なうことにより、基板 3 0 上に C プローブ 2 9 のみを捕捉することが可能となる。これにより、出力データを効率良く得ることができ、測定効率を向上することが可能である。

【0 0 5 0】

このようにして、標的核酸分子の検出又は定量は、A プローブ 2 1 および B プローブ 2 2 の両方が、該標的核酸分子 2 5 上でハイブリダイズされ、次に連結され、それにより得られた C プローブ 2 9 の標識物質 2 7 について、その有無又はその量を定性的または定量的に測定することにより行なうことが可能である。このように得られた測定データ、即ち、所望に応じて数値又は画像により、標的核酸分子 2 5 の有無または反応量を判定することが可能である。更に、判定結果を報告書や C R T 画面等に検出結果として、記録ないし表示するような装置を用いることも有利である。

【0 0 5 1】

なお、本発明は上述した例 1 又は 2 に限定されることなく、発明の要旨に基づいて、種々の変更が可能である。例えば、例 2 における、第 5 工程、即ち A プローブの除去工程（図 2 e）と、第 7 工程、即ち、B プローブ除去工程（図 2 g）の実施する順番は逆であってもよい。また、上記変性工程や検出工程等において使用される溶液の温度、緩衝液の組成等の実験条件は、適宜、選択してもよい。

【0 0 5 2】

本検出方法を用いれば、A プローブ 1 又は 2 1 と、B プローブ 2 又は 2 2 との

両方が、同一の核酸分子に対して正確にハイブリダイズすることが検出において必須となるために、より精度のよい検出を行なうことが可能である。また、余分に存在する B プローブ 2 又は 2 2 を大幅に減らすことが可能であるため、検出感度が向上する。

【0 0 5 3】

また、第 1 工程である、混合工程（図 1 a 又は図 2 a）において、A プローブ 1 又は 2 1 と、B プローブ 2 又は 2 2 との両方を、標的核酸分子 5 又は 2 5 よりも十分に多くなるような割合で存在させた条件で混合を行えば、標的核酸分子とのハイブリット体が生成される確率を高めることができる。

【0 0 5 4】

更にまた、本発明の方法の全ての工程で取り扱うサンプルは、全て溶液中で使用しているため、混合工程やその他の操作を行なう場合、分注用ノズル等を用いて行なうことが可能である。それにより、従来の方法に比べてより容易に検出方法を実行することが可能である。

【0 0 5 5】

例 3. 応用方法（2）

以下に、本発明の検出方法のもう 1 つの応用例について、図 3 及び 4 を用いて説明する。この方法を用いることにより、多種類の標的核酸分子を、高精度に且つ効率よく検出することが可能である。

【0 0 5 6】

この方法では、以下に示すような 2 種類の核酸プローブ（以下、単にプローブと称す）、即ち、A プローブ及び B プローブが使用される（図 3 a）。

【0 0 5 7】

A プローブは、標的核酸分子 4 5 の一部の領域の塩基配列に相補的な A 配列 4 3 と、A 配列 4 3 に結合する高親和性物質 4 7 からなる。ここで、高親和性物質 4 7 は、互いに特異的に高親和性を有する 2 つの物質の内の何れか一方の物質であり、例えば、ビオチン又はアビジン若しくはストレプトアビジン等である。また、高親和性物質 4 7 は、直接に A 配列 4 3 に結合しても、或いは任意の配列を解して間接的に A 配列 4 3 に結合してもよい。間接的に結合する場合の任意の配

列は、如何なる塩基配列であっても、如何なる塩基数であってもよい。好ましくは、標的核酸分子上の塩基配列に非相補的な配列である。ここで使用する「非相補的」の語は上記の定義の通りである。

【0 0 5 8】

本方法に使用される A 配列 3 は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 2 0 以上の塩基数を有する。

【0 0 5 9】

B プローブ 4 2 は、標的核酸分子 4 5 の一部の領域の塩基配列に相補的な配列であって、且つ A プローブに具備される A 配列 4 3 とは異なる配列である B 配列 4 4 と、B 配列 4 4 に結合し、且つ複数のユニットからなる任意の F L 配列 4 6 からなる。

【0 0 6 0】

本方法に使用される B 配列は、1 以上の塩基数を有し、より好ましくは 2 0 以上の塩基数を有する。

【0 0 6 1】

F L 配列 4 6 は、複数のユニットからなるが、各 1 ユニットは、1 0 塩基数以上とすることが可能であり、より好ましくは 1 5 塩基数を有する。

【0 0 6 2】

F L 配列 4 6 のユニット数は、何れでもよいが、解析の容易さから 4 ユニットとすることが好ましい。しかし、これに限られるものではなく、ユニット数は所望に応じて増減することが可能である。

【0 0 6 3】

複数の標的核酸分子を同時に検出する場合には、多種類のユニットを組み合わせ F L 配列を設計する。4 ユニットを設計する場合を例とすると、まず、1 0 種類のユニットを設計し、その中から 2 種類を選択する。その 2 ユニットにプライマーとなる S D ユニットと、もう 1 つのプライマーである E D ユニットを合わせて 4 ユニットを設計する。1 0 種類のユニットを用いて、各標的核酸分子の種類毎に、選択するユニットの種類を変えることにより、1 0 0 種類の異なる核酸配列を検出することが可能である。図 4 a 更に、1 0 種類のユニットは、各ユニ

ット内及び全てのユニットにおいてそのTm値を揃えて設計することが好ましい。これにより、後述する最終的な検出時のミスマッチを少なくするでき、且つ検出速度を上げることが可能になる。これにより、検出精度を向上すること、及び検出時間を短縮することが可能になる。また、ユニット数を増すことや、ユニットの種類を増すことにより、1 0 0 0 0 種類の異なる核酸配列をも検出することが可能である。

【0 0 6 4】

図 3 a に 4 ユニットからなる F L 配列の例を示した。該 4 ユニットは、後述するポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction; 以後、PCR 増幅又は PCR 反応と称す) においてプライマーとなる S D ユニットと、後に標的核酸分子の種類を認識するための認識用ユニットである D 0 ユニット及び C 1 ユニット、並びにもう 1 つのプライマー配列である E D ユニットからなる。これらの各ユニットは、後述の PCR 増幅において、夫々が読み取り枠となる。

【0 0 6 5】

先ず、上記の A プローブ 4 1 と B プローブ 4 2 を、例 1 に記載した通りに、標的核酸分子 4 5 と混合する (図 3 a)。このとき、試料に含まれる標的核酸分子 4 5 は、複数の異なる核酸分子群であってもよい。例えば、検出されるべき標的核酸分子の種類が 1 0 0 種類以下であるならば、D 0 ユニットは、D 0 - 1 から D 0 - 1 0 の 1 0 種類の中から選択され、且つ D 1 ユニットは、D 1 - 1 から D 1 - 1 0 の 1 0 種類の中から選択される。

【0 0 6 6】

第 2 工程において、A プローブ 4 1、B プローブ 4 2、及び標的核酸分子 4 5 をハイブリダイゼーションに適した条件で一定時間インキュベーションすることにより、ハイブリダイゼーション反応を行なう (図 3 b)。

【0 0 6 7】

ハイブリダイゼーションは、一般的な何れの手法によっても行なうことが可能である。好ましくは、適切な溶媒、例えば、アマシャム社製のハイブリダイゼーション緩衝液中で実行されるが、これに限られるものではない。

【 0 0 6 8 】

好ましいハイブリダイゼーションは、先ず、核酸の変性に有効な適宜の高温、例えば、90℃で5分間静置することにより、標的核酸分子の相補的結合を解除して2本鎖から1本鎖へと変性させる。次に、相補的塩基配列の再結合に有効な適宜の温度、例えば50℃にて2時間静置することにより、1本鎖の標的核酸が、相補的な塩基配列と再び結合する。かかるハイブリダイゼーションにより、Aプローブ41及びBプローブ42の両方が同一の標的核酸分子5上に結合してハイブリッドを生成する。この工程はハイブリダイゼーションを達成することが目的である。従って、使用する緩衝液の種類、温度条件、及び処理時間等は、これに限定される必要はなく、Aプローブ41及びBプローブ42が標的核酸分子45にハイブリダイズする条件であれば、どのような条件であってもよい。また、AプローブのA配列43及びBプローブ42のB配列44の塩基配列やその長さに応じて、適宜ハイブリダイゼーション反応温度や処理時間等を選択することが好ましい。

【 0 0 6 9 】

このとき、FL配列46に対して、非特異的な反応が生じないようにするために、その配列に相補的な塩基配列からなる蓋を形成してもよい。

【 0 0 7 0 】

第3工程において、標的核酸配列にハイブリダイズしたAプローブ43及びBプローブ44を連結する。連結に使用する連結剤は、例えば、前述したTaqDNAリガーゼ等を使用することが可能であり、より好ましくはTaqDNAリガーゼである。或いは、化学反応を用いて連結することも可能である。

【 0 0 7 1 】

第4工程において、前工程で得られた二本鎖をディネーチャリングすることによりCプローブ49を標的核酸分子45から切り離す(図3d)。ここで、変性処理は、熱的変性等により行なうことが可能であるが、熱的変性がより好ましい。ディネーチャリングの温度は、使用する塩基配列に依存して変更することが可能である。また、FL配列は、Tm値を比較的高い温度に設計しているため、本検出方法におけるハイブリダイゼーション、ライゲーション、ディネーチャリン

グ等の操作のための加熱又は冷却により変性することはない。

【0072】

第5工程では、Cプローブ49をB/F分離することと、並びに、FL配列46をPCRにより増幅し、更に、本プローブにより認識された核酸分子45の目的配列をコード化が達成される。

【0073】

まず、Cプローブ49に具備される高親和性物質47を、その対となるべき高親和性物質51を介して固相担体50に結合することにより、Cプローブ49を特異的に捕捉する(図3e)。例えば、高親和性物質47が、ビオチンである場合は、その対となるべき高親和性物質51はアビジン又はストレプトアビジンである。捕捉の後、例1に記載した適切な溶液により洗浄してB/F分離を完了する。

【0074】

前記固相担体50は、基板、ビーズ、容器、繊維、管、フィルター、アフィニティ・カラム、電極等を用いることが可能であるが、好ましくはビーズである。

【0075】

次に、高親和性物質51に捕捉された状態で、Cプローブ49のFL配列46に対してPCR増幅を行なう。予めFL配列46には、2つのプライマー配列が配置してあるので、このプライマー配列を利用してPCR反応を行なう。また、このとき、PCRのプライマーの3'末端をビオチン等の高親和性物質、例えば、上述した物質等で標識しておくことが好ましい。このときのPCRの詳細な条件は、設計したFL配列に依存する。

【0076】

第6工程において、PCR産物である配列52を回収する(図3f)。即ち、PCR反応終了後、固相担体に、例えば、アビジン等の対となる高親和性物質を固相したビーズ等の固相担体に結合することにより、PCR産物である配列52を回収する(図3f)。

【0077】

第7工程では、第6工程においてFL配列に対して行なったPCRの産物であ

る配列 5 2 の解析を行なう（図 3 g）。即ち、前記固相担体に結合した配列 5 2 を、F L 配列を設計する際に用いた、プライマーを除く全ユニットの塩基配列を有する核酸分子を含有する溶液中で反応させ、配列 5 2 の D 0' 及び D 1' に対して対応する核酸分子をハイブリダイズする。続いて、ハイブリダイズした 2 つの核酸分子をライゲーションにより連結し、3' 末端に標識物質 6 1 を結合する。ここで、ライゲーションの条件及び標識物質 6 1 に関する定義は上述した通りである。更に、得られた二本鎖配列 5 2 を固相担体に結合したままで洗浄した後に、ディネーチャリングし、E 核酸分子 6 1 を得る。

【0078】

得られた標識された E 核酸分子 6 1 の解析は、予め夫々の E 核酸分子に対して相補的な配列を有する核酸分子を固相化した DNA チップ、DNA キャピラリ等にハイブリダイズすることにより容易に行なうことが可能である。特に、DNA キャピラリを用いることにより、例えば、各 10 種類ずつ設計した配列、即ち、D 0 - 1 から D 0 - 10、及び D 1 - 1 から D 1 - 10 を行と列に分けて配置することにより、容易に分析することが可能になる。例えば、図 4 a に示す通りの行と列にプローブとなる核酸分子を配置することが可能である。

【0079】

例えば、各 10 種類の D 0 - 1 から D 0 - 10 と、D 1 - 0 から D 1 - 10 の配列を用いて F L 配列を設計した場合、図 4 a の 1 の位置には「(D 0 - 1) - (D 1 - 1)」に相当する配列が固定されることとなる。同様に、他の位置には行と列の関係により、相当する配列が固定されることとなる。このような行列の配置を、キャピラリの内側にプローブ配列を固定して使用する DNA キャピラリに対して用いる（図 4 b）。即ち、図 4 a の 1 の位置に相当する位置には、同じく、「(D 0 - 1) - (D 1 - 1)」に相当する配列が固定される。このようにプローブ配列を固定することにより容易に解析を行なうことが可能になる。ここでは、10 種類のユニットを用いた例を挙げたが、ユニットの種類は 10 種類に限られるものではなく、それ以下でも、それ以上でもよい。

【0080】

ここで使用する「DNA キャピラリ」とは、標的核酸分子を検出するための装

置であり、その内側に該標的核酸分子に対する相補的配列が結合されており、該相補的配列に標的核酸分子を結合することにより、該標的分子を検出する装置をいう。図 b に示す通り、多数の DNA キャピラリを同時に使用し、且つ斜線で示した部分に、互いに異なるプローブを配置することにより、同時に多くの標的核酸分子を検出することが可能となる。

【0081】

本方法を使用することにより、第 5 工程から第 6 工程で行なうエンコード反応、及び第 7 工程で行なうデコード反応の前に実施される PCR 反応を一定の条件で安定して行なうことが可能である。

【0082】

また、本方法では、第 7 工程のデコード反応により得られた塩基配列分子を DNA チップ又は DNA キャピラリ上で解析する際に、実施されるハイブリダイズの反応温度等の条件を均一化することが可能となるため、ミスマッチを防止することが可能となる。高い精度が得られる。また、一度に多くの解析を行なうことが可能であるため、検出時間の短縮化を達成することが可能である。

【0083】

ここで使用する「エンコード反応」とは、ある塩基配列を、物理的に配列の揃ったコードに変換することをいう。また、ここで使用する「デコード反応」とは、前記で変換された物理的コードの読み取りを行ない、それにより実質的に意味を有する生物学的配列を得ることをいう。

【0084】

また、ここでは、デコード反応を予め形成しておいた対応する塩基配列をハイブリダイズすることにより行なう例を示したが、適切な塩基を含む溶液中で PCR を行なうことにデコード反応を行なうことも可能である。

【0085】

I I I . 実施例

本発明の方法が、実際に有用であることを示すために以下のような実験を行なった。実施した検出方法の原理は、図 5 に示す通りである。まず、A プローブは、以下に詳述するが、検出対象である標的配列の一部分の配列に相補的な配列と

、その末端にビオチンを有する配列からなる。Bプローブは、以下に詳述するが、検出対象である標的配列の一部分の配列に相補的な配列と F L 配列と、及び、F L 配列にハイブリダイズした相補的な配列であって末端に蛍光物質の結合した検出用配列からなる。前記の A プローブと B プローブを標的配列にハイブリダイズし、2つのプローブ間をライゲーションし、標的配列をディネーションにより除去した後に、前記蛍光物質が結合した F L 配列の相補鎖である検出用配列をディネーションして回収し、該蛍光物質を検出する。

【0086】

1. 標的配列と変異配列

使用する標的配列は、図 6 に記載する通りの r-32-f1、即ち
r-32-f1: CTCTA GGGCT CTTAT GGACT TCACC CTACT AG-f1
である。また、検出方法の特異性を確認するために使用する標的配列とその配列が異なる変異配列として、f1-neg-r-32AB、即ち
f1-neg-r-32AB:
f1-CGTCC TGCCT TCGAC TCCTG ATGAA CCGCG CTGCC CCTTG ACCAG CATG
を用いた。

【0087】

2. プローブと検出用配列

A プローブは、図 6 に記載する通り、b-16A、即ち
b-16A: b-CTAGT AGGGT GAAGT C
である。また、B プローブは、図 6 に示す通り、P-16B-48、即ち、
p-16B-48:
P-CATAA GAGCC CTAGA GCATG CTGGT CAAGG GGCAC GCGGT TCATC AGGAG TCGAA GGCA
G GACG
であり、蛍光プローブを有する B' プローブ、即ち、検出用配列は、f1-r-48で
あり、即ち、
f1-r-48: f1-CGTCC TGCCT TCGAC TCCTG ATGAA CCGCG TGCCC CTTGA CCAGC ATG
である。

【0088】

3. 実験方法

上記のプローブ等を用いて、標的配列の検出を試みた。まず、夫々、pH 8.0 の TE 緩衝液中の 100 μ M の B プローブ溶液を 5 μ l と、31.5 μ M の B' プローブ溶液（即ち、検出用配列）を混合し、95℃で1分間インキュベーションし、その後、7分間かけて25℃とし2本鎖とした。

【0089】

この2本鎖化したBプローブと、標的配列と、Aプローブとを混合し、100 μ l のリゲーション用緩衝液中で20 U のリガーゼ（New England Biolab 社製）でライゲーション反応を行なった。この反応は、70℃から55℃まで5分間かけて温度を下げ、次いで、23℃に温度を下げることにより進行した。アビジンを固相したビーズに上記のライゲーション後の試料を加え、30℃でプロコールドウォッシュ（pre-cold wash）を行ない、未反応の標的配列を除去した。上清を除去した後、TE 緩衝液を100 μ l 添加し、70℃で洗浄、即ち、ホットウォッシュ（hot wash）を行ない、所謂、エンコードされたB' プローブを回収した。

【0090】

4. 実験結果

以下に検出結果を示す。図7は、各々の洗浄過程において上清から得られた配列をキャピラリー電気泳動により検出したものである。各グラフから明示される通り、プレウォッシュで回収された上清には、ライゲーション反応に付されなかった標的配列が回収されたことが示された。また、コールドウォッシュにより回収された上清には、ライゲーションに付された塩基配列の標的配列が回収されたことが示された。また、ホットウォッシュにより回収された上清中には、検出用配列が回収され、その塩基長に相応する長さのDNAが検出されたことが示された。

【0091】

図8は、標的配列の濃度と回収された検出用配列の濃度との関係を検討した結果を示すグラフである。これは、上述の方法において添加した標的配列の濃度を、夫々、0、5、10、20、25及び50 nM と変えた場合に検出された検出

用配列の回収率をパーセンテージで示した結果である。グラフから明らかであるように、標的配列の濃度が増加するに従い、検出された検出用配列の回収率も増加した。このことは、本検出方法が有用であることの証明の 1 つとなる。

【0092】

図 9 は、標的配列の一部の塩基配列を置換した変異配列が検出系に存在している場合における、標的配列に対する特異性について検討した結果である。上述の方法において、標的配列を添加すると同時に、変異配列を 5、50 及び 100 pmol / 100 μ l で各々添加した。その結果、図 9 に示す通り、変異配列の存在は、検出用配列の回収率に顕著な影響を与えなかった。この結果から、従って、本検出方法により特異的に標的配列が検出できることが証明された。

【0093】

【発明の効果】

本発明の方法によれば、A プローブと B プローブを確実に含む C プローブのみを、特異的に選別して回収することが可能であり、それによって、未反応のプローブや非特異的にハイブリダイズしたプローブとの識別を容易にし、それにより、標的核酸分子の存在の正確な指標とすることが可能である。従って、より正確な検出結果を得ることが可能となり、また、測定効率も向上する。

【0094】

更に、本発明の検出方法により複数の標的核酸分子を同時に検出する際に、多種類のユニットを組み合わせることで FL 配列を設計すれば、各標的核酸分子の種類毎に、選択するユニットの種類とその順列を変えることにより、非常に多くの種類の異なる核酸配列を同時に高精度に且つ効率よく検出することが可能である。また、夫々のユニットの T_m 値を揃えて設計することにより、最終的な検出時のミスマッチを少なくすることができ、検出速度を上げることが可能になる。これにより、検出精度を向上すること、及び検出時間を短縮することが可能になる。

【0095】

なお、本発明は次のような発明の概念も請求する。

【0096】

- (1) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

5) 前記プローブ C に具備される前記工程で結合に関与しない標的物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法。

【 0 0 9 7 】

(2) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) 前記プローブ C を標的核酸分子から分離、或いは前記プローブ C に結合した標的核酸分子を分解する工程と、

5) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [こ

ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

6) 前記プローブ C に具備される前記工程で結合に関与しない標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法。

【 0 0 9 8 】

(3) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

5) 前記プローブ C を高親和性物質 S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブ C を再び回収する工程と、

6) 前記プローブ C に具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、
を具備する検出方法。

【 0 0 9 9 】

(4) 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、

1) 前記目的とする標的核酸分子の一部分の配列に相補的な A 配列と、A 配列に結合している標識物質 A t a g を含む A プローブと、

前記目的とする標的核酸分子の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と、B 配列に結合している標識物質 B t a g を含む B プローブとを準備する工程と、

2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸分子とハイブリダイズする工程と、

、

3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションしてプローブ C を得る工程と、

4) 前記プローブ C を標的核酸分子から分離、或いは前記プローブ C に結合した標識核酸分子を分解する工程と、

5) プローブ C に具備される標識物質 A t a g 或いは B t a g の何れか一方 [ここで、これを t a g 1 とする] にたいして特異的に高親和性を有する物質 S 1 に標識物質 t a g 1 を結合させることによりプローブ C を回収する工程と、

6) 前記プローブ C を高親和性物質 S 1 から分離した後、前記工程で結合に関与しなかった標識物質 [ここで、これを t a g 2 とする] に対して特異的に高親和性を有する物質 S 2 に標識物質 t a g 2 を結合させることによりプローブ C を再び回収する工程と、

7) 前記プローブ C に具備される標識物質 t a g 1 を選択的に検出する工程と、を具備する検出方法。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の検出方法の好ましい例を示すフローチャート。

【図 2】 本発明の検出方法の好ましい例を示すフローチャート。

【図 3】 本発明の検出方法の好ましい例を示すフローチャート。

【図 4】 本発明の検出方法の好ましい例を示す図。

【図 5】 実験を行なった本検出方法の原理を示す図。

【図 6】 本発明のプローブ、標的配列及び検出用配列の例を示す図。

【図 7】 キャピラリ電気泳動の結果を示すチャート。

【図 8】 標的配列濃度と検出用配列の回収率との関係を示すグラフ。

【図 9】 変異配列濃度と検出用配列の回収率との関係を示すグラフ。

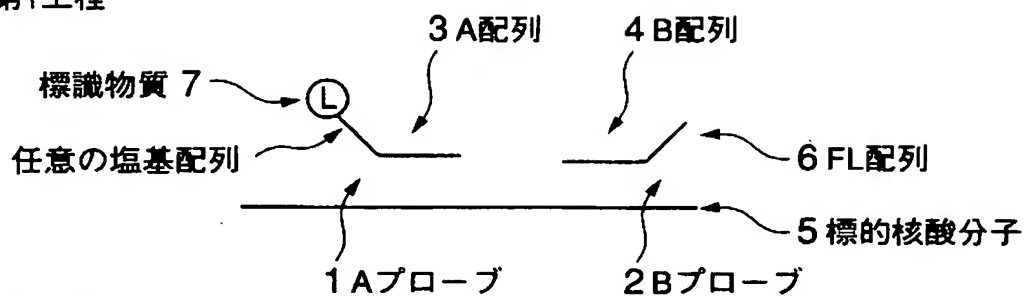
【符号の説明】

- 1. A プローブ 2. B プローブ 3. A 配列 4. B 配列
- 5. 標的核酸分子 6. フラッグ配列 7. 標識物質 8. 結合部位
- 9. C プローブ 10. 固定基板 11. F L 配列に相補的な配列

【書類名】 図面

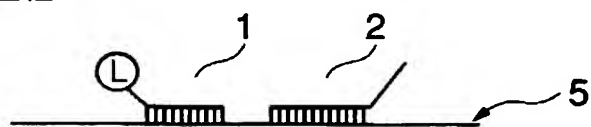
【図 1】

a) 第1工程



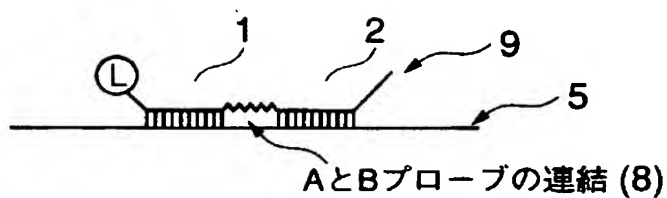
b) 第2工程

ハイブリダイゼーション過程



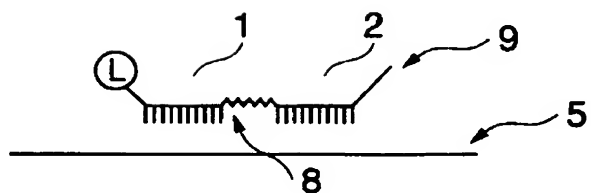
c) 第3工程

連結過程



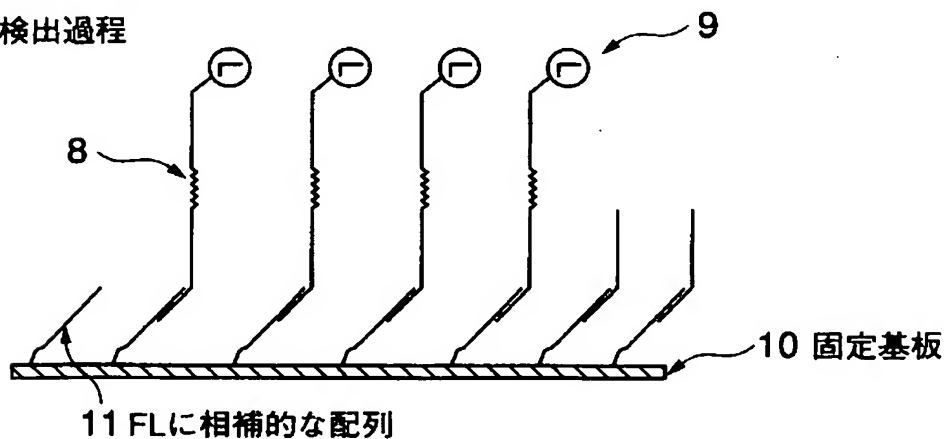
d) 第4工程

変性過程

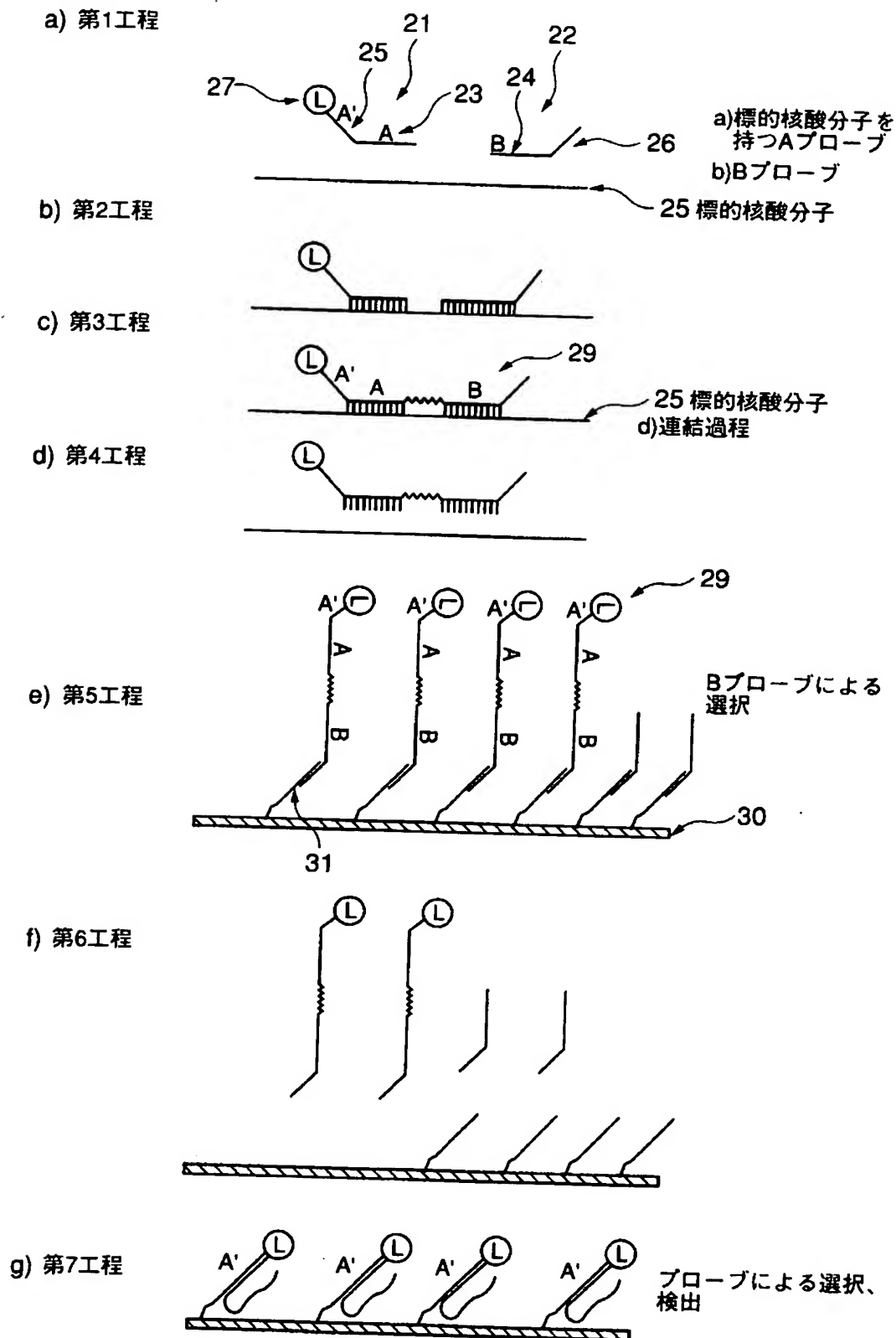


e) 第5工程

検出過程

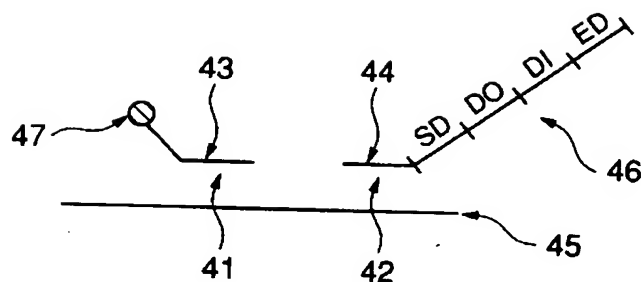


【図 2】

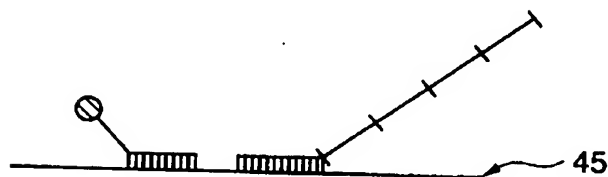


【図 3】

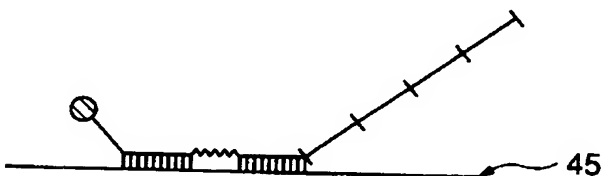
a) 第1工程



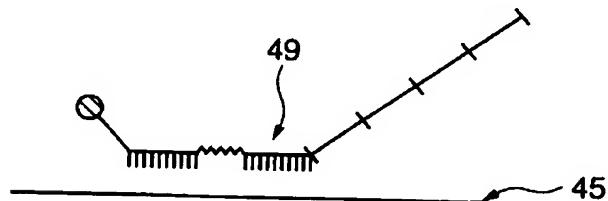
b) 第2工程



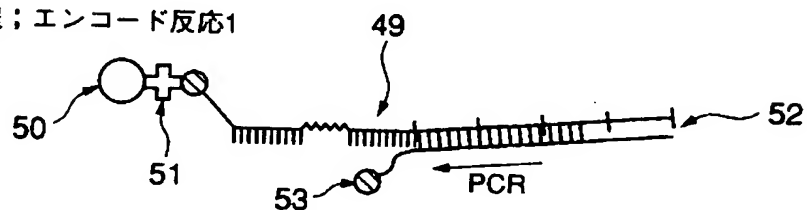
c) 第3工程



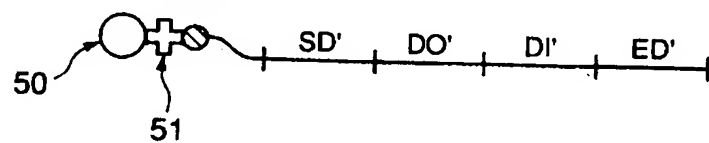
d) 第4工程



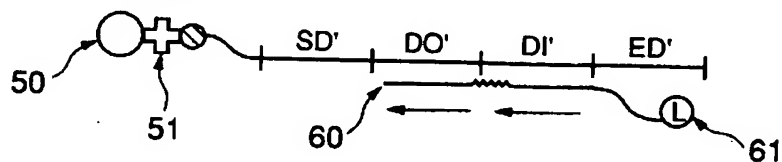
e) 第5工程；エンコード反応1



f) 第6工程；エンコード反応2



g) 第7工程；デコード反応

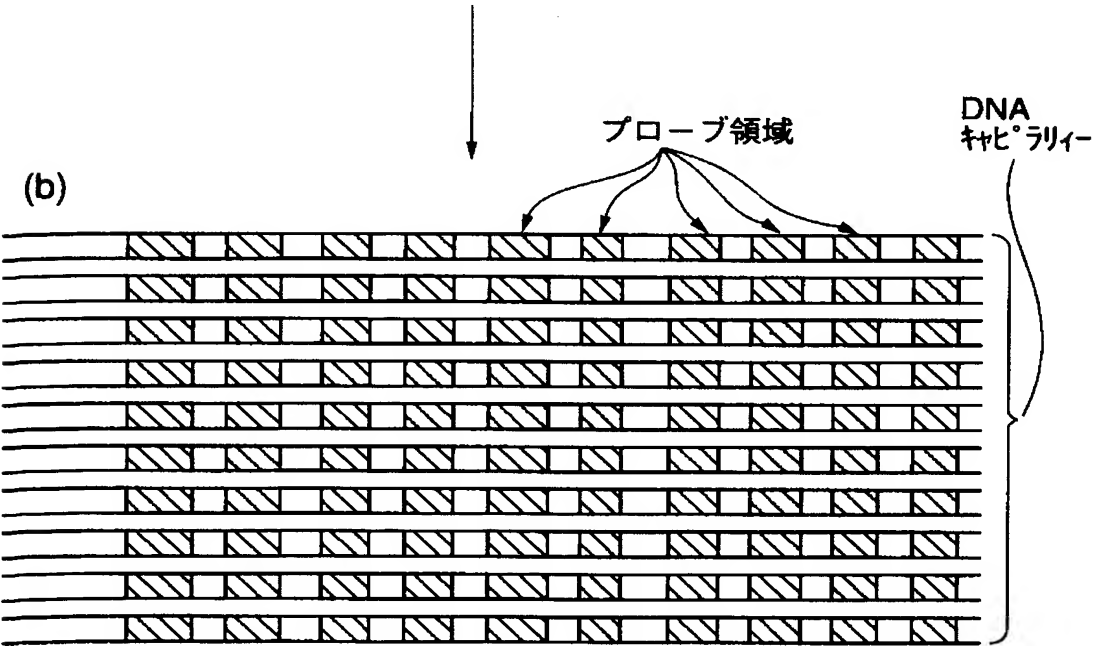


【図 4】

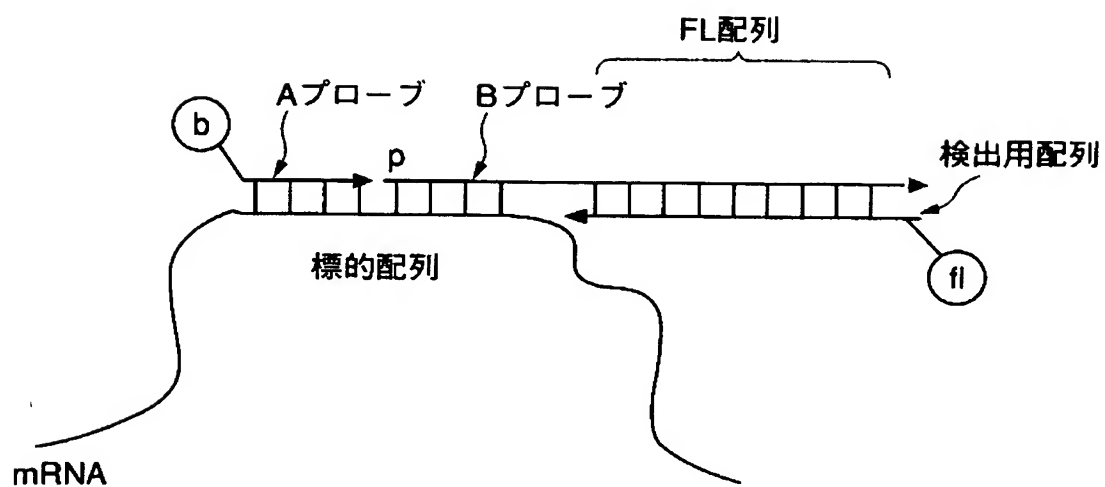
(a)

		D0									
		D0-1	D0-2	D0-3	D0-4	D0-5	D0-6	D0-7	D0-8	D0-9	D0-10
D1	D1-1	1									
	D1-2										
	D1-3										
	D1-4										
	D1-5										
	D1-6										
	D1-7										
	D1-8										
	D1-9										
	D1-10										

(b)



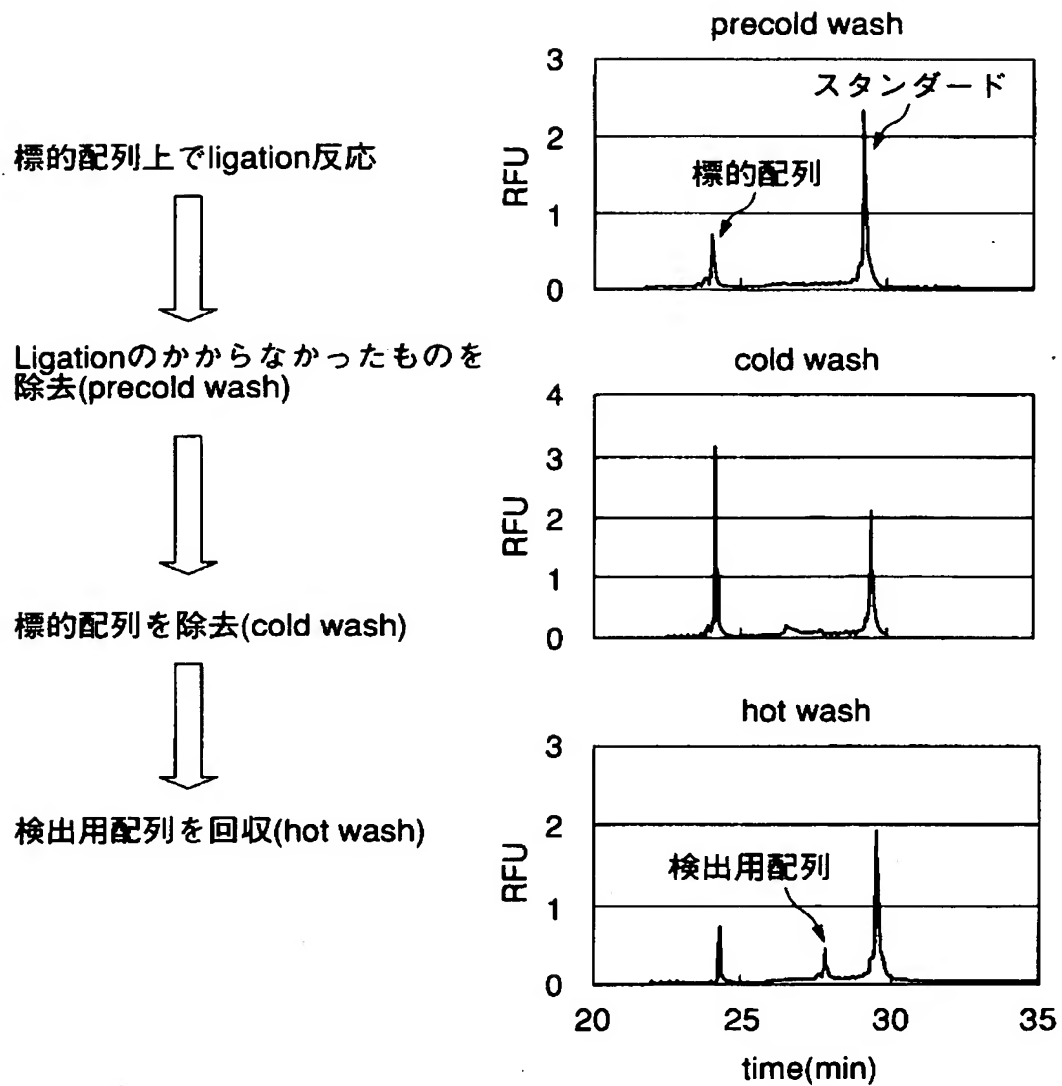
【図 5】



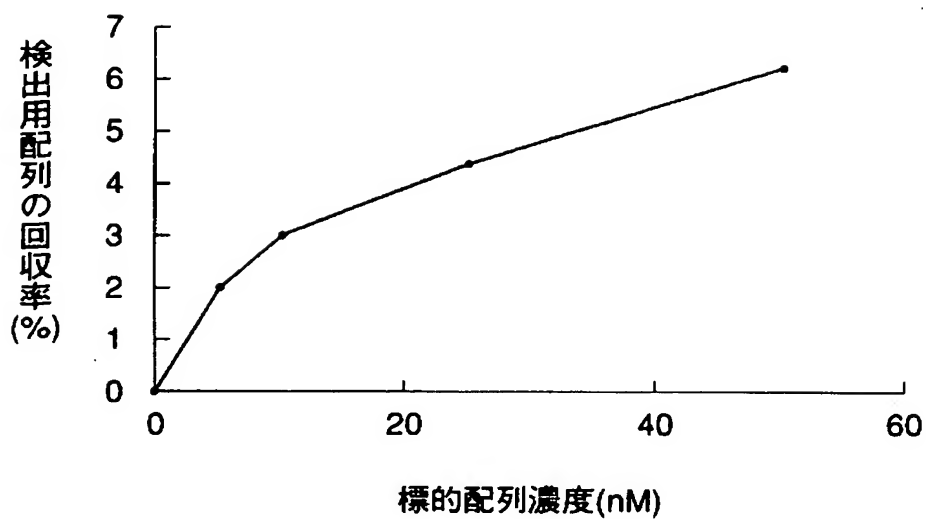
【図 6】

name	sequence(5'→3')
b-16A	b-CTAgTAgggTgAAgTC
P-16B-48	P-CATAAgAgCCCTAgAgCATgCTggTCAAggggCACgCggTTCATCAGgAgTCgAAggCAGgACg
r-32-fl	CTCTAgggCTCTTATggACTTCACCCCTACTAg-fl (標的配列)
fl-r-48	fl-CgTCCTgCCTTCgACTCCTgATgAACCGgTgCCCCCTgACCAgCATg (検出用配列)
fl-neg-r-32AB	fl-TTCTAgAgCTCCTATggACTTCGCCCTACTAg (変異配列)

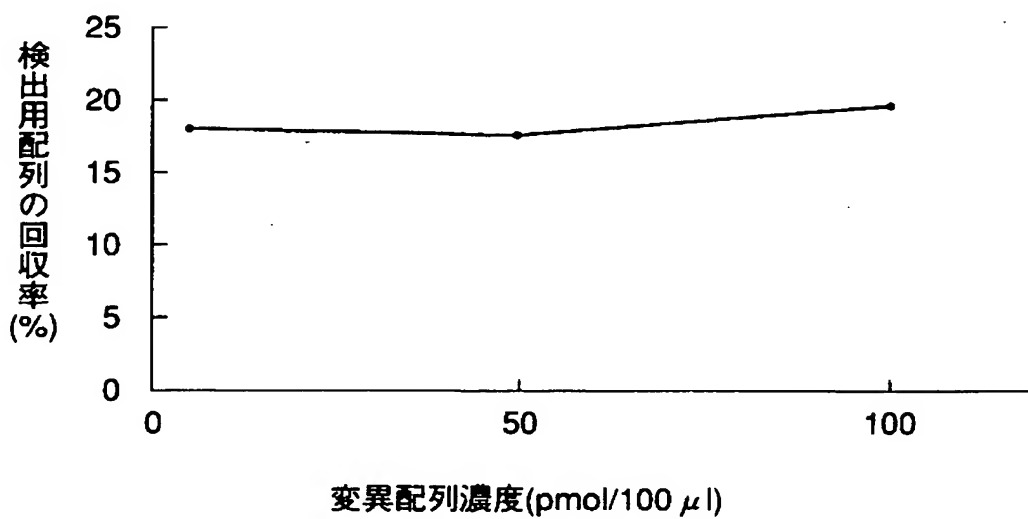
【図 7】



【図 8】



【図 9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 目的とする標的核酸分子を高精度に且つ効率よく検出することができる方法を提供することを目的とする。

【解決手段】 目的とする配列を有する標的核酸分子を検出する方法であって、
1) 前記目的とする配列の一部分の配列に相補的な A 配列と A 配列に結合している標的物質とからなる A プローブと前記目的とする配列の前記一部分の配列とは異なる部分の配列に相補的な B 配列と B 配列に結合した任意のフラッグ配列とからなる B プローブとを準備する工程と、2) A プローブ及び B プローブを前記標的核酸配列分子とハイブリダイズする工程と、3) 同一の標的核酸分子上にハイブリダイズした A プローブと B プローブとをライゲーションし C プローブを得る工程と、4) C プローブに具備される F L 配列を、F L 配列に相補的な配列にハイブリダイズすることにより C プローブを回収する工程と、並びに 4) 前記 C プローブに具備される標識物質 L を選択的に検出する工程とを具備する検出方法。

【選択図】 なし

特願平 1 1 - 2 8 3 4 3 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 3 7 6]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号

氏 名

オリンパス光学工業株式会社

2. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号

氏 名

オリンパス株式会社